



## Impaired Toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 研一郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/275">http://hdl.handle.net/10271/275</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 400号	学位授与年月日	平成16年 3月10日
氏名	鈴木 研一郎		
論文題目	<p>Impaired Toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA                      (肺胞マクロファージにおける CpG DNA に対する反応性をともなわないトールライクレセプター9発現の低下)</p>		

博士(医学) 鈴木 研一郎

## 論文題目

Impaired Toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA

(肺胞マクロファージにおけるCpG DNAに対する反応性をともなわないトールライクレセプター9発現の低下)

## 論文の内容の要旨

## 〔はじめに〕

肺胞マクロファージは肺胞腔内に存在し、肺に侵入した抗原に接触し種々の免疫反応を介して肺の感染防御に重要な役割を担っている。自然免疫において細菌由来のDNAやリポ多糖体(LPS)やリポタイコ酸(LTA)などの病原体特異的な分子パターンに対する受容体の発現が重要であり、これらはトールライクレセプター(TLR)と呼ばれる一群の受容体であることが近年明らかとなった。しかし肺胞マクロファージにおけるTLRの発現は殆ど検討されていない。また、細菌由来のDNAに含まれる非メチル化CpGモチーフはマクロファージ、樹状細胞やB細胞に対する免疫賦活作用をもち、そのレセプターはTLR9と報告されている。CpGモチーフを含む合成オリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)の肺内への投与はIL-12産生を介してTh1優位の免疫反応を来すが、肺のどの免疫担当細胞がTLR9を発現し、CpG-ODNに反応するかについてはわかっていない。そこで、肺胞マクロファージにおけるTLR9の発現とCpG-ODNに対する反応を検討し、他臓器由来のマクロファージ(骨髄由来マクロファージ・腹腔マクロファージ)や、肺の他の抗原提示細胞(肺樹状細胞、肺B細胞)と比較した。

## 〔材料ならびに方法〕

10週齢の雄性BALB/cマウスを用い、肺胞マクロファージは気管支肺胞洗浄にて回収した。骨髄由来マクロファージは骨髄細胞をL929細胞上清を用いて7日間培養し分化させた。腹腔マクロファージはthioglycollateを腹腔内投与4日後に採取した。肺樹状細胞は肺を酵素処理し単細胞とした後に90分培養し浮遊細胞を除き、さらに一晚培養した後の浮遊細胞を磁気ビーズを用い、CD45R陰性かつMHC class II陽性細胞を回収した。肺B細胞は酵素処理後の肺の細胞よりCD45R陽性細胞を磁気ビーズを用いて採取した。各細胞集団のTLR2、4、9のmRNA発現をリアルタイムPCRで定量化し、各細胞集団のTLRリガンド刺激(LTA、LPS、CpG-ODN)によるサイトカイン産生(IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40)をELISAで、共刺激分子(CD40、CD80、CD86)の発現をFACSで検討した。さらに肺胞マクロファージを*in vitro*および*in vivo*でLPSで刺激し、TLR9発現の変化をリアルタイムPCRで検討した。

## 〔結果〕

各種のマクロファージのうち骨髄由来マクロファージと腹腔マクロファージではTLR9の発現がみられたが、肺胞マクロファージはTLR9のmRNAを殆ど発現していなかった。TLR2とTLR4は全てのマクロファージで発現しており、TLR2は骨髄由来マクロファージで最も高く発現し、TLR4は骨髄由来マクロファージと腹腔マクロファージで肺胞マクロファージより高発現であった。CpG-ODNに対するサイトカイン産生能は骨髄由来マクロファージと腹腔マクロファージはIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40を産生したが、肺胞マクロファージはいずれのサイトカインも産生しなかった。また、CpG-ODNは骨髄由来マクロファ-

ジと腹腔マクロファージにおいて共刺激分子の発現を増強したが、肺胞マクロファージではその発現に変化はみられなかった。一方、LTAやLPSの刺激により肺胞マクロファージはIL-6やTNF- $\alpha$ を産生した。肺胞マクロファージ以外の肺の抗原提示細胞である肺樹状細胞や肺B細胞はTLR9を発現し、B細胞でより高発現であった。その一方、TLR2とTLR4は樹状細胞やB細胞よりも肺胞マクロファージにおける発現が高かった。CpG-ODN刺激により肺樹状細胞はIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40を産生し、共刺激分子の発現が増強した。また、肺B細胞はCpG-ODN刺激によりIL-6を産生した。LPSはin vitro、in vivoでの刺激で、肺胞マクロファージのTLR9発現に影響を与えなかった。

#### [考察]

肺胞マクロファージは下気道において最初に病原体に接触しうる細胞であり、我々は肺胞マクロファージが肺においてCpGモチーフを認識する主要な細胞であると予想した。しかし、今回の結果は肺胞マクロファージがTLR9を殆ど発現せず、CpG-ODNに反応しないことを示しており、これは他の臓器由来のマクロファージと異なる特徴であった。さらにLPS刺激によってもTLR9の発現は影響されず、これは炎症状態においても肺胞マクロファージがTLR9を発現しないことを示唆する。また最近、肺胞マクロファージは他臓器のマクロファージと異なり炎症の抑制や解消に重要な役割を担っていることが知られており、TLR9発現の低下が細菌由来のDNAによる過剰な免疫を制御している可能性が考えられた。さらに肺の他の抗原提示細胞においても同様の検討をおこなった。マウスにおいてはTLR9はヒトと異なりプラズマサイトイド系樹状細胞だけでなくミエロイド系樹状細胞にも発現しているとされている。今回得られた肺の樹状細胞の表現型はミエロイド系樹状細胞で、TLR9を発現しており過去の報告と一致した。さらにB細胞ではTLR9の発現はさらに多く、樹状細胞とB細胞がともに細菌由来のDNAに反応することが示唆された。近年CpG-ODN投与により肺局所ではIL-12産生を介して喘息などのアレルギー性炎症を抑制する可能性が報告されている。今回の我々の検討におけるTLR9の発現量とIL-12産生量から細菌由来のDNAに対するIL-12産生は主に樹状細胞であると考えられた。

#### [結論]

肺胞マクロファージは選択的にTLR9を発現しておらず、CpG-ODNに対する免疫応答を惹起しない。これはマクロファージのなかで肺胞マクロファージにのみ観察される特徴である。また、肺の抗原提示細胞においては樹状細胞とB細胞はTLR9を発現しCpG-ODN刺激により免疫応答がみられる。以上から、肺において細菌由来のDNAに対する免疫応答は樹状細胞とB細胞が担っていると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

Toll-like receptor (TLR) 分子はショウジョウバエの抗真菌ペプチドであるdrosomycinを誘導するToll受容体が保存されたものであり、ヒトでは遺伝子重複によりTLR 1~11が存在することが確認されている。これらTLRのリガンドはほぼ解明されており、各々グラム陰性菌、陽性菌、ウイルスなどを認識し、自然免疫を誘導するのみならず、適応免疫にも重要な役割を果たすことが知られている。肺胞マクロファージ (AM) は肺においてさまざまな外来抗原に曝され、生体防御に重要な役割を果たしている。そこで、申請者はAMにおけるTLRの発現とその機能を腹腔マクロファージ (PM)、骨髄由来マクロファージ (BM)、および抗原提示細胞である肺樹状細胞 (DC)、肺B細胞とで比較検討した。細胞の調整は次のように行った。

AM: BALB/cマウスより気管支肺胞洗浄にて回収した。PM: チオグリコレートを腹腔内投与4日後に採取した。BM: 骨髓細胞をL929細胞上清にて7日間培養し、分化させた。肺DC: 肺を酵素処理し、単細胞とした後、磁気ビーズ法にてCD45R陰性、MHCクラスII陽性細胞を回収した。肺B細胞: 酵素処理した肺よりCD45R陽性細胞を回収した。これらの細胞を用いて、各細胞集団のTLR2、4、9のmRNA発現をリアルタイムPCRで定量化した。また、TLR2のリガンドであるリポタイコ酸(LTA)、TLR4のリガンドであるリポ多糖体(LPS)、TLR9のリガンドであるCpGモチーフを含む合成オリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)で各細胞集団を刺激後、サイトカイン(IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40)をELISAで、共刺激分子(CD40、CD80、CD86)の発現をflow cytometryで解析した。得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) TLR mRNA発現: TLR2とTLR4の発現は全てのマクロファージで認められたが、TLR9の発現はAMでのみ認められなかった。しかし、肺DCではTLR9の発現が認められた。また、肺B細胞でも検索した全てのTLRが発現していた
- (2) サイトカイン産生: TLRの発現パターンと一致して、CpG-ODN刺激によるAMのIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40産生は認めなかった。これに対し、PM、BMはこれらサイトカインを産生した。また、AMもLTAやLPSにより、IL-6およびTNF- $\alpha$ を産生した。TLR9を発現している肺DCは、予想通りCpG-ODN刺激によるIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40を産生した。ところが、TLR9を高発現している肺B細胞はCpG-ODN刺激により、少量のIL-6を産生するのみであった。
- (3) 共刺激分子: CpG-ODN刺激により、PMおよびBMは共刺激分子を発現増強したが、AMではこの現象は観察されなかった。
- (4) LPSによる*in vitro*および*in vivo*の刺激でAMのTLR9発現誘導は認めなかった。

以上より、申請者はAMがTLR9を発現しておらず、細菌由来DNAやCpG-ODNに対する肺での応答は主に肺DCによることを証明した。

審査委員会では、AMは他臓器マクロファージと異なり、TLR9を発現しておらず、その機能も認めないことを初めて証明した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) AM、PM、BMの回収方法について
- 2) 回収したマクロファージの純度の測定法について
- 3) TLR 2、4、9 の発現を測定した理由は
- 4) TLR分子の発現を蛋白レベルで測定したか
- 5) LPSでIL-12p40が産生誘導されない理由は
- 6) CpG刺激で量依存的反応が認められない理由は
- 7) マクロファージに発現されるCD40、80、86の役割について
- 8) なぜ肺ではミエロイドDCしか認められないのか
- 9) DCの電顕像における核の形態について
- 10) B細胞はTLR9を強く発現しているのに、CpGにほとんど反応しない理由は
- 11) AMのTLR9発現不全の生理学的意義について
- 12) 生体内における肺サーファクタントの存在下でのAMの機能について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫  
副査 宮 本 愛 副査 大 西 一 功